饲养密度对肉鸡盲肠菌群多样性、挥发性脂肪酸和血清脑肠肽的影响

常双双[1, 2] 柳青秀[1] 张敏红[1*] 石玉祥[2] 冯京海[1]

（1.中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，动物营养学国家重点实验室，北京 100193；2. 河北工程大学农学院，邯郸 056021；）

摘 要：本试验旨在研究饲养密度对肉鸡盲肠菌群多样性、挥发性脂肪酸和血清脑肠肽的影响。试验采用单因素设计，选取 22 日龄健康、体重相近的爱拔益加肉鸡 144 只，随机分成 3 个组，每组 6 个重复，每个重复单笼饲养。将 3 个组的肉鸡转入环境温度为 21 ℃、相对湿度为 60%的环境控制舱适应 7 d。29 日龄时开始正式试验，单个鸡笼饲养面积为 0.64 m^2，饲养密度分别设置为每笼 6 只（公母各占 1/2，Ⅰ组）、每笼 8 只（公母各占 1/2，Ⅱ组）和每笼 10 只（公母占 1/2，Ⅲ组），环境温度为 21 ℃，相对湿度为 60%，试验条件维持至试验结束，共计 14 d。结果表明：1)Ⅲ组肉鸡盲肠菌群丰富度和多样性最高，且该组的饲养密度有利于肉鸡盲肠 *Clostridium termitidis* 和 *Bacteroides vulgatus* 的定植。2）饲养密度对肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量的影响无显著差异（$P>0.05$）。3）试验第 14 天，Ⅲ组肉鸡血清血管活性肽（VIP）含量显著低于Ⅰ组和Ⅱ组（$P<0.05$），而 3 个组间血清 5–羟色胺和 P 物质含量无显著差异（$P>0.05$）。综上，饲养密度可改变肉鸡盲肠菌群多样性与结构以及血清血管活性肽含量，但不影响盲肠挥发性脂肪酸的含量。

关键词：饲养密度；盲肠菌群；挥发性脂肪酸；血清脑肠肽；肉鸡

中图分类号：S831.4

家禽业为了提高单位面积的产出及其经济效益，一直以来都十分关注饲养密度[1]。虽然较高的饲养密度可以带来较高的生产利润，但却对家禽的生产性能、健康和福利等方面产生负面影响。已有研究报道饲养密度对肉鸡生长性能、行为、肠道菌群及福利水平等方面的影响。高饲养密度（24 只/m^2）显著降低肉鸡体重、平均日增重以及平均日采食量[2-3]；高饲养密度影响步态得分[4]，且鸡只腿部容易发生皮炎[5-6]；各饲养密度间（900、675、540、450 和 380 cm^2/只）肉鸡盲肠菌群结构相似性较低（33.1%~65.4%），即各饲养密度条件下肉鸡盲肠肠道菌群差异较大[7]。挥发性脂肪酸也称短链脂肪酸，是菌群代谢的主要产物和重要信息分子，不仅起到稳定菌群结构的作用，还参与肠道免疫动力和肠上皮屏障的调节[8]，短链脂肪酸可降低肠道 pH，达到促进益生菌的生长增殖并抑制特定病原菌定植的目的[9-11]。另外有研究表明肠道菌群与脑肠肽的分泌是相互作用的[12]，如双歧杆菌四联活菌片可显著升高血管活性肽（vasoactive intestinal polypeptide，VIP）的水平，降低 P 物质（substance P，SP）

收稿日期：2017–08–15

基金项目：国家"十三五"重点研发计划课题"肉禽舒适环境的适宜参数及限值研究"（2016YFD0500509)；动物营养学国家重点实验室自主研究课题"热环境影响肉鸡健康生长的分子机制" （2004DA125184G1609）

作者简介：常双双（1992—），女，河北沧州人，硕士研究生，养殖专业。E-mail: 2403486624@qq.com

*通信作者：张敏红，研究员，博士生导师，E-mail: zmh66@126.com

的水平[13]。现已发现 5–羟色胺（5-HT）、VIP 和 SP 等脑肠肽与胃肠活动相关[14]，但是目前针对饲养密度对肉鸡血清脑肠肽、盲肠挥发性脂肪酸影响的研究鲜有报道。因此本试验旨在研究饲养密度对肉鸡血清脑肠肽、盲肠挥发性脂肪酸和菌群多样性的影响，以期为肉鸡合理饲养密度的确定提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验设计

试验采用单因素设计，选取 22 日龄健康、体重相近的爱拔益加肉鸡 144 只，随机分成 3 个组，每组 6 个重复（1 个鸡笼即为 1 个重复）。将 3 个组的肉鸡转入环境温度为 21 ℃、相对湿度为 60%的环境控制舱适应 7 d。29 日龄时开始正式试验，单个鸡笼饲养面积为 0.64 m^2，饲养密度分别设置为每笼 6 只（公母各占 1/2，Ⅰ组）、每笼 8 只（公母各占 1/2，Ⅱ组）和每笼 10 只（公母各占 1/2，Ⅲ组），环境温度为 21 ℃，相对湿度为 60%，试验条件维持至试验结束，共计 14 d。试验在动物营养学国家重点实验室环境控制舱内进行，温度、相对湿度自动控制（精度分别为±1 ℃和±7%），无风，24 h 光照。

1.2　试验饲粮

采用玉米–豆粕型饲粮，所用饲粮为参照 NRC(1994)营养需要配制的粉状配合饲粮，基础饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　基础饲粮组成及营养水平(饲喂基础)

Table 1　Composition and nutrient levels of the basal diet (as-fed basis)　　%

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
玉米 Corn	56.51
豆粕 Soybean meal	35.52
豆油 Soybean oil	4.50
食盐 NaCl	0.30
石粉 Limestone	1.00
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.78
DL–蛋氨酸 *DL*-Met	0.11
预混料 Premix1)	0.28
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels2)	
代谢能 ME/(MJ/kg)	12.73
粗蛋白质 CP	20.07
钙 Ca	0.90
有效磷 AP	0.40
赖氨酸 Lys	1.00
蛋氨酸 Met	0.42
蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.78

1)预混料为每千克饲粮提供 Premix provided the following per kg of the diet：VA 10 000 IU，VD_3 3 400 IU，VE 16 IU，VK_3 2.0 mg，VB_1 2.0 mg，VB_2 6.4 mg，VB_6 2.0 mg，VB_{12} 0.012 mg，泛酸钙 pantothenic acid calcium 10 mg，烟酸 nicotinic acid 26 mg，叶酸 folic acid 1 mg，生物素 biotin 0.1 mg，胆碱 choline 500 mg，Zn ($ZnSO_4·7H_2O$) 40 mg，Fe ($FeSO_4·7H_2O$) 80 mg，Cu ($CuSO_4·5H_2O$) 8 mg，Mn ($MnSO_4·H_2O$) 80 mg，I (KI) 0.35 mg，Se (Na_2SeO_3) 0.15 mg。

2)计算值 Calculated values。

1.3　饲养管理

试验肉鸡均采用单层平养，所选用笼具为本实验室研发的单层平养笼具[15]，自由采食与饮水，常规免疫。

1.4　测定指标与方法

1.4.1　血液采集与指标测定

分别于试验第 7 天和第 14 天，每组随机选取 6 只肉鸡（公母各占 1/2，每个重复 1 只肉鸡），采用静脉采血，静置 2 h 后，3 000 r/min 低温离心 10 min 吸取血清，至－80 ℃冰箱保存。

采用酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）法测定血清中 5-HT、VIP 和 SP 的含量。

1.4.2　盲肠内容物的采集与指标测定

1.4.2.1　盲肠内容物的采集

分别于试验第 7 天和第 14 天，每组随机选取 6 只肉鸡（公母各占 1/2，每个重复 1 只肉鸡），剪断颈静脉处死，全身消毒后剖开腹腔，分离肠道，结扎回盲交界处，剪下盲肠迅速移至超净工作台，用无菌剪刀剪开肠壁，收集盲肠内容物，装置无菌离心管中，液氮速冻，－80 ℃保存备用。

1.4.2.2　挥发性脂肪酸含量的测定

称取 2 g 左右盲肠食糜置于离心管中，然后准确加入 5 mL 超纯水，旋涡振荡 3~5 min，5 000×*g* 离心 10 min；取上清液 1 mL 置于塑料安培管中，加入 0.2 mL 的 25%偏磷酸溶液，盖紧盖子，振荡摇匀，并置冰水浴中 30 min；10 000×*g* 离心 10 min，取上清液，上机测定盲肠内容物中乙酸、丙酸、丁酸及戊酸的含量。

1.4.2.3　DNA 的提取

采用 Fast DNA™ SPIN Kit For Soil 提取样品基因组 DNA。

1.4.2.4　细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列，引物信息见表 2。

表 2　引物信息

Table 2　Primer information

引物 Primers	序列 Sequences

338F	CCTACG GGAGGC AGCAG
518R	ATTACC GCG GCT GCT GG
GC-338F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGGGCCTACG GGAGGC AGCAG

PCR 扩增体系（50 μL）为：10×PCR buffer 5 μL；dNTP Mixture（2.5 mmol/L）3.2 μL；ExTaq（5 U/μL）0.4 μL；GC-338F（20 μmol/L）1 μL；518R（20 μmol/L）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH_2O 至 50 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T-gradient，凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel–Doc2000 凝胶成像系统。

1.4.2.5　PCR 产物的变性梯度凝胶电泳（DGGE）分析

取 10 μL PCR 的产物进行 DGGE 分析。采用变性梯度为 35%～55%、浓度为 7%的聚丙烯酰胺凝胶在 1×TAE 缓冲液中 150 V、60 ℃下电泳 5 h。DGGE 完毕后，采用银染法染色，步骤如下：1)固定液（乙醇 50 mL、冰醋酸 2.5 mL，定容至 500 mL）固定 15 min；2)Milli-Q 纯水清洗 20 s 和 2 min 各 1 次；3)银染液（硝酸银 1 g、37%甲醛 0.75 mL，定容至 500 mL）染色 15 min；4)Milli-Q 纯水清洗 20 s 和 2 min 各 1 次；5)显色液（氢氧化钠 7.5 g、37%甲醛 2.5 mL，定容至 500 mL）显色 5~7 min；6）最后用终止液（乙醇 50 mL、冰醋酸 2.5 mL，定容至 500 mL）终止反应。

1.4.2.6　DGGE 图谱中优势电泳条带的序列测定

DGGE 凝胶条带回收后，以 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增，PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至 DH5α感受态细胞中，筛选阳性克隆测序。测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型。每个回收条带选取 3 个克隆进行序列测定。

1.5　数据处理

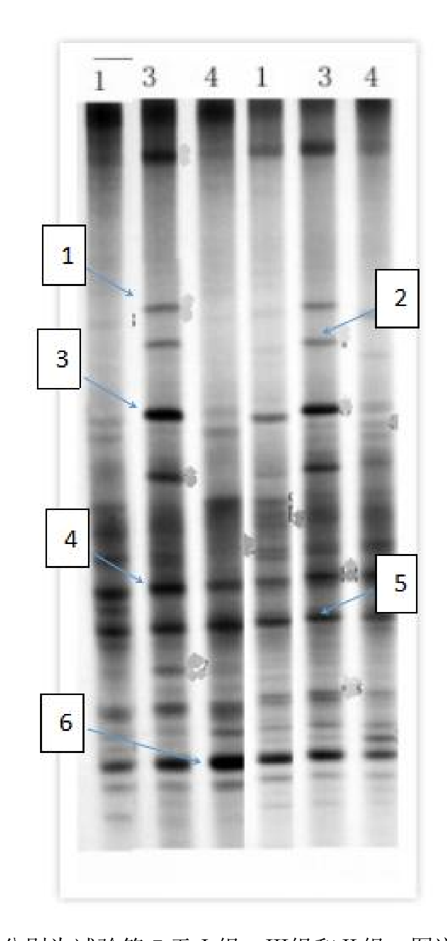
试验数据使用 SAS 9.2 统计分析软件进行单因素分析（one-way ANOVA），采用 Duncan 氏法进行多重比较，P<0.05 为差异显著；采用软件 Quantity One 分析 DGGE 图谱多样性。

2　结果与分析

2.1　肉鸡盲肠菌群多样性

2.1.1　肉鸡盲肠菌群 PCR-DGGE 扩增指纹图谱分析

由图 1 和图 2 可知，试验第 7 天，Ⅰ组和Ⅲ组肉鸡盲肠菌群条带数高于Ⅱ组；试验第 14 天，Ⅲ组肉鸡盲肠菌群条带数高于Ⅰ组和Ⅱ组。由表 3 可知，相同试验时间内不同饲养密度下肉鸡盲肠菌群相似性指数为 54.0%~80.3%，其中试验第 7 天，Ⅰ组和Ⅲ组间菌群结构相似性最低，相似性指数仅为 54.0%，而试验第 14 天，Ⅰ组和Ⅱ组间菌群结构相似性最高，相似性指数仅为 80.3%。总体来看，随着肉鸡日龄的增长，饲养密度对肉鸡盲肠菌群结构的影响也随之发生变化，且Ⅲ组与Ⅰ组间比Ⅲ组与Ⅱ组间菌群结构相似性较低，表明Ⅲ组与Ⅰ组间比Ⅲ组与Ⅱ组间盲肠菌群结构差异大。



图谱左侧条带编号 1、3 和 4 分别为试验第 7 天Ⅰ组、Ⅲ组和Ⅱ组，图谱右侧条带编号 1、3 和 4 分别试验第 14 天Ⅰ组、Ⅲ组和Ⅱ组。

The left band numbered 1, 3 and 4 were groups Ⅰ, Ⅲ and Ⅱ on the 7th day of the experiment, and the right band numbered 1, 3, 4 were groups Ⅰ, Ⅲ and Ⅱ on the 14th day of the experiment, respectively.

图 1　肉鸡盲肠内容物菌群 DGGE 图谱

Fig.1　DGGE profiles of microflora in cecal contents of broilers

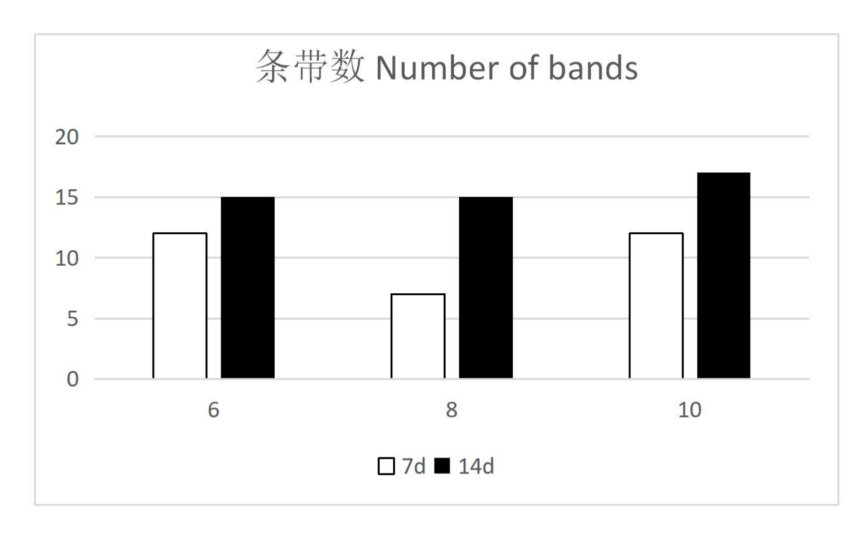


图 2　3 个组间盲肠菌群条带数比较

Fig.2　Comparison of cecal microflora band number in three groups

表 3　戴斯系数比较 PCR-DGGE 图谱的相似性

Table 3　Similarity of PCR-DGGE profiles compared by Deiss coefficient　　　　%

项目 Items	第 7 天 The 7th day			第 14 天 The 14th day		
	Ⅰ组 Group Ⅰ	Ⅱ组 Group Ⅱ	Ⅲ组 Group Ⅲ	Ⅰ组 Group Ⅰ	Ⅱ组 Group Ⅱ	Ⅲ组 Group Ⅲ
第 7 天 The 7th day						
Ⅰ组 Group Ⅰ	100.0	64.9	54.0	44.8	40.8	52.5
Ⅱ组 Group Ⅱ	64.9	100.0	61.9	22.3	27.1	31.8
Ⅲ组 Group Ⅲ	54.0	61.9	100.0	38.4	37.8	63.5
第 14 天 The 14th day						
Ⅰ组 Group Ⅰ	44.8	22.3	38.4	100.0	80.3	58.2
Ⅱ组 Group Ⅱ	40.8	27.1	37.8	80.3	100.0	55.7
Ⅲ组 Group Ⅲ	52.5	31.8	63.5	58.2	55.7	100.0

2.1.2　肉鸡肠道菌群结构多样性分析

由表 4 可知，饲养密度不同，肉鸡盲肠菌群多样性指数也不同。试验第 7 天，Ⅰ组肉鸡盲肠菌群香农指数和辛普森指数分别为 2.441 和 0.910，Ⅱ组分别为 1.921 和 0.850，Ⅲ组分别为 2.453 和 0.912。试验第 14 天，Ⅰ组肉鸡盲肠菌群香农指数和辛普森指数分别为 2.649 和 0.926，Ⅱ组分别为 2.659 和 0.927，Ⅲ组分别为 2.787 和 0.936。整个试验期间Ⅲ组肉鸡盲肠菌群香农指数和辛普森多样性指数均高于其他 2 个组。由此可见，饲养密度为每 0.64m^2 10 只时肉鸡盲肠菌群多样性和丰富度最佳。

表 4　肉鸡盲肠菌群结构多样性分析

Table 4　Analysis of the diversity of cecal microbial structure of broilers

项目 Items	香农指数 Shannon index	均匀度 Evenness	辛普森指数 Simpson index	丰富度 Richness
第 7 天 The 7th day				
Ⅰ组 Group Ⅰ	2.442	0.983	0.910	12
Ⅱ组 Group Ⅱ	1.921	0.987	0.850	7
Ⅲ组 Group Ⅲ	2.453	0.987	0.912	12
第 14 天 The 14th day				
Ⅰ组 Group Ⅰ	2.649	0.978	0.926	15
Ⅱ组 Group Ⅱ	2.659	0.982	0.927	15
Ⅲ组 Group Ⅲ	2.787	0.984	0.936	17

2.1.3　肉鸡肠道特异性菌群和共性菌群分析

从肉鸡肠道菌群 16SrDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱中分别割胶回收了 2 条特异性条带和 4 条共性条带，由图 1 和表 5 可知，试验第 7 天和第 14 天 3 个组肉鸡盲肠内容物菌群中均检测出共性条带 3 号菌条带(*Holdemanella biformis*)、4 号菌条带(单形拟杆菌，*Bacteroides*

uniformis)、5 号菌条带(*Eisenbergiella massiliensis*)和 6 号菌条带（*Ruminococcus faecis*），仅III组肉鸡盲肠内容物菌群检测出 1 号菌条带（*Clostridium termitidis*）和 2 号菌条带（普通拟杆菌，*Bacteroides vulgatus*）。

在 6 个测序结果中，条序列分布于厚壁菌门（Firmicutes）和拟杆菌门（Bacteroidetes），与 GenBank 数据库中细菌的相似度均在 90%以上。

表 5　DGGE 图谱中条带的基因片段序列比对

Table 5　Comparison of genomic sequences of bands from DGGE profiles

条带编号 Band number	GenBank 数据库中最相近的菌种名称 The most similar bacteria name in the GenBank database	登录号 Accession number	相似度 Similarity/%	细菌所属门 Bacteria belonging to phyla
1	*Clostridium termitidis*	NR_117111.1	90	厚壁菌门 Firmicutes
2	普通拟杆菌 *Bacteroides vulgatus*	NR_074515.1	99	拟杆菌门 Bacteroidetes
3	*Holdemanella biformis*	NR_044731.2	93	
4	单形拟杆菌 *Bacteroides uniformis*	NR_112945.1	99	拟杆菌门 Bacteroidetes
5	*Eisenbergiella massiliensis*	NR_144731.1	100	
6	*Ruminococcus faecis*	NR_116747.1	99	厚壁菌门 Firmicutes

2.2　肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量

由表 6 可知，试验第 7 天和 14 天，饲养密度对肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量的影响无显著差异（P>0.05）。但是总体分析，II组肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量要略低于其他 2 组。

表 6　肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量

Table 6　The contents of volatile fatty acids in cecum of broilers　　　　mmol/L

项目 Items	时间 Time	组别 Groups I	II	III	*P* 值 *P*-value
乙酸	第 7 天 The 7th day	2.35±0.99	1.80±0.55	2.26±0.84	0.460 7
Acetic acid	第 14 天 The 14th day	2.47±0.66	2.11±0.70	2.28±1.03	0.752 3
丙酸	第 7 天 The 7th day	0.32±0.12	0.31±0.22	0.52±0.17	0.105 6
Propionic acid	第 14 天 The 14th day	0.49±0.15	0.38±0.09	0.45±0.21	0.481 1
丁酸	第 7 天 The 7th day	1.14±0.69	0.89±0.36	1.43±0.33	0.244 2
Butyric acid	第 14 天 The 14th day	1.09±0.37	1.11±0.58	1.10±0.47	0.997 7
戊酸	第 7 天 The 7th day	0.13±0.06	0.11±0.06	0.16±0.07	0.486 8
Pentanoic acid	第 14 天 The 14th day	0.17±0.06	0.12±0.03	0.11±0.06	0.179 1

同行数据肩标无字母或相同字母表示差异不显著(P>0.05)，不同字母表示差异显著(P<0.05)。下表同。

In the same row, values with no letter or the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05),

while with different letter superscripts mean significant difference (*P*<0.05). The same as below.

2.3 肉鸡血清脑肠肽含量

由表 7 可知，试验第 7 天，饲养密度对肉鸡血清 5-HT、VIP 和 SP 含量的影响无显著差异（*P*>0.05）；试验第 14 天，III组肉鸡血清 VIP 含量显著低于 I 组和 II 组（*P*<0.05），而 3 个组间血清 5-HT 和 SP 含量无显著差异（*P*>0.05）。

表 7 肉鸡血清脑肠肽含量

Table 7 The contents of serum brain gut peptides of broilers pg/mL

项目 Items	时间 Time	组别 Groups I	II	III	*P* 值 *P*-value
5-羟色胺 5-HT	第 7 天 The 7th day	210.64±25.19	221.13±27.54	218.89±19.41	0.737 7
	第 14 天 The 14th day	151.99±25.15	172.90±21.96	166.20±23.90	0.323 6
血管活性肽 VIP	第 7 天 The 7th day	167.06±29.12	162.12±20.24	178.81±24.64	0.507 6
	第 14 天 The 14th day	144.04±18.37a	124.63±16.72a	102.56±7.11b	0.004 6
P 物质 SP	第 7 天 The 7th day	7.567±2.26	7.465±1.51	6.652±1.71	0.652 5
	第 14 天 The 14th day	7.660±1.96	6.700±2.08	7.957±1.38	0.4802

3 讨 论

3.1 饲养密度对肉鸡盲肠菌群多样性的影响

肠道中的微生物对于宿主的营养消化吸收、免疫系统发育、机体能量代谢等具有重要的生理调节作用[16]。肠道菌群结构的平衡可有效地抑制病原微生物的侵袭，改善动物健康和生产性能[17]。但在应激(包括饲养密度过高或过低)条件下，肠道菌群平衡会被打破，可能会产生大量致病菌，容易致病，影响动物的健康生长[18]。Guardia 等[19]报道，在 3 周龄时饲养密度显著影响肉鸡消化道菌群变化，变化最明显的是嗉囊和盲肠菌群（相似性分析 *R* 值分别为 0.77 和 0.69，*P*≤0.05）；6 周龄时饲养密度对嗉囊和盲肠菌群的影响存在显著差异（相似性分析 *R* 值分别为 0.52 和 0.27，*P*≤0.05）。本试验研究结果显示，III组肉鸡盲肠菌群丰富度和相似性高于 I 组和 II 组，表明每 0.64 m^2 10 只的饲养密度有利于肉鸡维持盲肠菌群生长与保持平衡。

鸡盲肠中细菌主要是厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门[20]。研究报道，随着饲养密度增加，即饲养密度高于 450 cm^2/只时，笼养蛋鸡十二指肠中有益菌(*Lactobacillus gastricus* 和

Lactobacillus alvi)消失，并对肠道菌群平衡产生不利影响[21]。本试验结果发现，III组肉鸡盲肠中检测出特异性菌群 *Clostridium termitidis* 和 *Bacteroides vulgatus*，而另外 2 个组并未发现。*Clostridium termitidis* 属于厚壁菌门，研究表明，后肠微生物区系中的优势菌群是厚壁菌门，其含量大约占 60%~70%，其中丁酸盐产生菌对肠上皮细胞的发育具有重要作用[22]；*Bacteroides vulgatus* 属于拟杆菌门，拟杆菌门是肠道革兰氏阴性菌中数量最大的一类细菌，产降解植物细胞壁的酶，参与植物细胞壁的降解，从而与肠道的消化功能有关[23]。

3.2　饲养密度对肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量的影响

短链脂肪酸如乙酸、丙酸及丁酸等为肠道中碳水化合物及蛋白质发酵后的主要产物，肠道微生物产生的短链脂肪酸 95%以上可被宿主吸收及代谢[24]。挥发性脂肪酸对宿主有着重要的生理功能，如调节肠道菌群，维持体液和电解质的平衡，给宿主提供能量，给肠道上皮细胞提供营养等[25]。而家禽的消化道中均有挥发性脂肪酸的存在，其中以盲肠为主要产生部位，且浓度较高[26]。本试验结果发现，饲养密度对肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量的影响无显著差异，但却发现 II 组肉鸡盲肠挥发性脂肪酸含量要略低于其他 2 个组，其原因可能是 II 组肉鸡盲肠中发酵产生挥发性脂肪酸的微生物要低于其他 2 组。

3.3　饲养密度对肉鸡血清脑肠肽含量的影响

在胃肠和中枢神经系统中双重分布的神经肽类激素称为脑肠肽，作为神经传递介质或调节介质作用于胃肠道感觉神经末梢或平滑肌细胞的相应受体，调节胃肠道感觉与运动。其中血液循环中的脑肠肽类激素可随着血液，进入下丘脑，直接作用于弓状核相关化能受体，产生生物学效应[27-28]。

5-HT 主要由肠内分泌细胞产生，参与调解肠道运动、感觉，直接或间接刺激肠道分泌。据报道，在生命早期缺乏菌群的时候，会导致血浆色氨酸水平的升高[12]。还有研究表明双歧杆菌则可以影响色氨酸的代谢[29]，口服婴儿双歧杆菌可诱导大鼠神经递质多巴胺、5-HT 血浆浓度升高[30]。VIP 具有降低平滑肌紧张度、抑制胃肠运动和刺激胃肠分泌等作用[31]。此外还能改善肠黏膜组织微循环及内环境，为肠上皮细胞提供营养物质和氧，并清除过多的氧自由基等有害物质[32]，减少脂多糖对肠黏膜的损伤，促进有益菌的定殖使菌群比例恢复正常[33]。SP 本身又是一种速激肽，可增加胃肠蠕动，强烈促消化道平滑肌收缩，加强结肠的集团推进运动，刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质，使胃肠道的血管扩张，通透性增高，血浆外渗，并参与炎症过程和免疫反应[34]。

本研究发现，仅在试验第 14 天，III组肉鸡血清 VIP 含量显著低于 I 组和 II 组，这可能与肠道内环境与菌群结构的变化相关，有待进一步探究；而适温条件 21 ℃下，饲养密度对肉鸡血清 5-HT 和 SP 含量的影响无显著差异。

4　结　论

① III组肉鸡盲肠菌群丰富度和相似性高于 I 组和 II 组，同时该组饲养密度有利于 *Clostridium termitidis* 和 *Bacteroides vulgatus* 的定殖。

② 饲养密度对肉鸡盲肠发挥性脂肪酸含量的影响无显著差异。

③ III组肉鸡血清 VIP 含量显著低于 I 组和 II 组，但饲养密度对肉鸡血清 5-HT 和 SP 含量的影响无显著差异。

参考文献：

[1]张福锁.中国养分资源综合管理策略和技术[C]//循环农业与新农村建设——2006 年中国农学会学术年会论文集.北京:中国农学会,2006:371–374.

[2]邵丹,张珊,施寿荣,等.饲养密度对黄羽肉鸡生产性能、免疫器官指数和肉品质的影响[J].动物营养学报,2015,27(4):1230–1235.

[3]TONG H B,LU J,ZOU J M,et al.Effects of stocking density on growth performance,carcass yield,and immune status of a local chicken breed[J].Poultry Science,2012,91(3):667–673.

[4]ESTEVEZ I.Density allowances for broilers:where to set the limits?[J].Poultry Science,2007,86(6):1265–1272.

[5]DOZIER W A,THAXTON J P,BRANTON S L,et al.Stocking density effects on growth performance and processing yields of heavy broilers[J].Poultry Science,2005,84(8):1332–1338.

[6]ARNOULD C,FAURE J M.Use of pen space and activity of broiler chickens reared at two different densities[J].Applied Animal Behaviour Science,2003,84(4):281–296.

[7]赵乾宇.饲养密度对笼养蛋鸡小肠组织结构和盲肠细菌种群的影响[D].硕士学位论文.大庆:黑龙江八一农垦大学,2015.

[8]徐万里,陆高,梁世杰,等.短链脂肪酸介导的菌群－宿主互动与肠易激综合征的研究进展[J].世界华人消化杂志,2015,36(23):5815–5822.

[9]ESWARAN S,MUIR J,CHEY W D.Fiber and functional gastrointestinal disorders[J].The American Journal of Gastroenterology,2013,108(5):718–727.

[10]SILK D B A,DAVIS A,VULEVIC J,et al.Clinical trial:the effects of a trans-galactooligosaccharide prebiotic on faecal microbiota and symptoms in irritable bowel syndrome[J].Alimentary Pharmacology & Therapeutics,2009,29(5):508–518.

[11]FUKUDA S,TOH H,HASE K,et al.Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate[J].Nature,2011,469(7331):543–547.

[12]白宇,胡云霞,陈俊伟,等.细菌－脑－肠轴理论体系的建立[J].东南大学学报（医学版）,2016,35(5):781–785.

[13]傅丽霞.双歧杆菌四联活菌片治疗腹泻型肠易激综合征患者的疗效及对血清脑肠肽水平的影响[J].中国微生态学杂志,2017,29(2):179–181.

[14]陈倩.隔药灸脐法对脾气虚型肠易激综合征患者血清脑肠肽影响的临床研究[D].硕士学位论文.济南:山东中医药大学,2011.

[15]张敏红,苏红光,冯京海.采集用于建立肉鸡生活环境舒适性评价模型数据的方法和专用装置:中国,CN103404447A[P].2015–11–18.

[16]PAN D,YU Z T.Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet[J].Gut

Microbes,2014,5(1):108–119.
[17]肖英平,杨彩梅,代兵,等.基于高通量测序的丁酸梭菌对肉鸡盲肠菌群结构的影响[J].浙江农业学报,2017,29(3):373–379.
[18]SEKELJA M,RUD I,KNUTSEN S H,et al.Abrupt temporal fluctuations in the chicken fecal microbiota are explained by its gastrointestinal origin[J].Applied and Environmental Microbiology,2012,78(8):2941–2948.
[19]GUARDIA S,KONSAK B,COMBES S,et al.Effects of stocking density on the growth performance and digestive microbiota of broiler chickens[J].Poultry Science,2011,90(9):1878–1889.
[20]QU A,BRULC J M,WILSON M K,et al.Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome[J].PLoS One,2008,3(8):e2945.
[21]于江明,王秋菊,刘勃麟,等.不同饲养密度对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群的影响[J].动物营养学报,2016,28(3):899–907.
[22]PRYDE S E,DUNCAN S H,HOLD G L,et al.The microbiology of butyrate formation in the human colon[J].FEMS Microbiology Letters,2002,217(2):133–139.
[23]彭骞骞,王雪敏,张敏红,等.持续偏热环境对肉鸡盲肠菌群多样性的影响[J].中国农业科学,2016,49(1):186–194.
[24]GIBSON G R,MACFARLANE G T.Human colonic bacteria:role in nutrition,physiology and pathology[M].Boca Raton:CRC Press,1995.
[25]陈燕,曹郁生,刘晓华.短链脂肪酸与肠道菌群[J].江西科学,2006,24(1):38–40,69.
[26]ANNISON E F,HILL K J,KENWORTHY R.Volatile fatty acids in the digestive tract of the fowl[J].British Journal of Nutrition,1968,22(2):207–216.
[27]DOCKRAY G J.Cholecystokinin and gut–brain signalling[J].Regulatory Peptides,2009,155(1/2/3):6–10.
[28]TOMITA R.Regulation of vasoactive intestinal peptide and substance P in the human pyloric sphincter[J].Hepato-Gastroenterology,2009,56(94/95):1403–1406.
[29]DESBONNET L,GARRETT L,CLARKE G,et al.The probiotic *Bifidobacteria infantis*:an assessment of potential antidepressant properties in the rat[J].Journal of Psychiatric Research,2008,43(2):164–174.
[30]DESBONNET L,GARRETT L,CLARKE G,et al.Effects of the probiotic *Bifidobacterium infantis* in the maternal separation model of depression[J].Neuroscience,2010,170(4):1179–1188.
[31]HAMRMAR A J,FAHRENKRUG J,GOZES I,et al.Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide:IUPHAR Review[J].British Journal of Pharmacology,2012,166(1):4–17.
[32]吴美玉,胡团敏.血管活性肠肽与消化系疾病的研究进展[J].世界华人消化杂志,2012,20(16):1453–1457.

[33]CAMPOS-SALINAS J,CAVAZZUTI A,O'VALLE F,et al.Therapeutic efficacy of stable analogues of vasoactive intestinal peptide against pathogens[J].Journal of Biological Chemistry,2014,289(21):14583–14599.
[34]陈晓敏,张燕华,吴跃龙.肠易激综合征结肠黏膜P物质和血管活性肠肽变化的研究[J].实用临床医药杂志,2008,12(11):31–33.

Effects of Stocking Density on Cecal Microflora Diversity, Cecal Volatile Fatty Acids and Serum Brain Gut Peptides of Broilers

CHANG Shuangshuang[1,2] LIU Qingxiu[1] ZHANG Minhong[1*] SHI Yuxiang[2] FENG Jinghai[1]
(1. *State Key Laboratory of Animal Nutrition*, *Institute of Animal Science*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*; 2. *College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan* 056021, *China*)

Abstract: The study was conducted to investigate the effects of stocking density on cecal microflora diversity, cecal volatile fatty acids and serum brain gut peptides of broilers. A single factor design was adopted in the experiment and one hundred and forty-four 22-day-old healthy Arbor Acres broilers with similar body weight were randomly divided into three groups, each group contained six cages and each cage as a replicate. The pre-test period lasted for 7 days and broilers were kept at 21 ℃ temperature and 60% relative humidity. When broilers were 29-day-old, with the area of single chicken cage was 0.64 m^2, the stocking density was 6 birds each cage (half male and half female, group Ⅰ), 8 birds each cage (half male and half female, group Ⅱ) and 10 birds each cage (half male and half female, group Ⅲ) respectively under 21 ℃ temperature and 60% relative humidity, and the trial lasted for 14 days. The results showed as follows: 1) the richness and diversity of cecal microflora of broilers were the highest in group Ⅲ, and the stocking density in this group was beneficial to the growth of cecal *Clostridium termitidis* and *Bacteroides vulgatus* of broilers. 2) The influence of stocking density on the volatile fatty acid contents in the cecum of broilers was not significantly different (P>0.05). 3) At the 14th day of the experiment, the serum vasoactive intestinal peptide (VIP) content of broilers in group Ⅲ was significantly higher than those in groups Ⅰ and Ⅱ (P<0.05), but there were no significant difference on serum contents of 5-hydroxytryptamine and substance P of broilers among three groups (P>0.05). In conclusion, the stocking density can change the diversity and structure of cecal microflora as well as serum VIP content, but does not affect the contents of volatile fatty

acids in the cecum of broilers.

Key words: stocking density; cecal microflora; volatile fatty acid; brain gut peptide; broilers

i

*Corresponding author, professor, E-mail: zmh66@126.com (责任编辑　田艳明)